

Cara uji kimia – Bagian 14: Penentuan kadar sulfit dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan



© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	1
4 Peralatan	1
5 Pereaksi.....	2
6 Kondisi KCKT	2
7 Prosedur	2
8 Pelaporan	4
9 Keamanan dan keselamatan kerja	4
Lampiran A (informatif) Validasi metode penentuan kadar sulfit	5
Bibliografi	10
Tabel 1 – Persiapan <i>blanko</i> , <i>spike</i> dan contoh uji	3
Tabel A.1 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi blanko LOD	6
Tabel A.2 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi blanko LOQ	7
Tabel A.3 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi spiking 50 mg/kg	8
Tabel A.4 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi spiking 150 mg/kg	8
Tabel A.5 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi spiking 300 mg/kg	9
Gambar A.1 - Linieritas kurva kalibrasi.....	5
Gambar A.2 - Linieritas spike contoh.....	6

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan komoditas hasil perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan, yang telah dirumuskan melalui rapat teknis, dan rapat konsensus pada tanggal 17 September 2015 di Bogor dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 10 Desember 2015 sampai dengan 10 Februari 2016 dengan hasil akhir RASNI.



Pendahuluan

Penyusunan SNI ini, memperhatikan ketentuan dalam:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
2. Peraturan Kepala Badan Pengawasan Obat dan Makanan RI Nomor HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan.





Cara uji kimia – Bagian 14: Penentuan kadar sulfit dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) pada produk perikanan

1 Ruang lingkup

Standar ini digunakan untuk menentukan kadar sulfit total pada produk perikanan.

2 Istilah dan definisi

2.1

sulfit

senyawa yang mengandung ion SO_3^{2-} yang merupakan basa konjugat dari asam sulfat. Sulfit biasanya digunakan dalam bentuk gas SO_2 , garam Na atau K-sulfit, bisulfit dan metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Sulfit dan garamnya berada dalam bentuk yang sangat dipengaruhi oleh pH larutan pada saat terlarut dalam air

2.2

metode analisa secara KCKT

suatu teknik analisa kualitatif dan kuantitatif yang didasarkan pada pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi deferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase yaitu fase diam dan fase cair yang bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat terpisah berdasarkan perbedaan mobilitas karena perbedaan muatan ion

2.3

waktuambat atau *Retention Time (RT)*

waktu yang diperlukan analit/senyawa selama tertahan dalam kolom sampai keluar sebagai puncak kromatogram dihitung dari waktu injeksi

3 Prinsip

Sulfit diekstrak dari jaringan daging contoh menggunakan larutan ekstraksi alkali (*alkaline extraction solution*) untuk melepaskan SO_2 . Besarnya sulfit diukur secara KCKT dengan detektor Ultra Violet pada panjang gelombang 276 nm dengan menggunakan satu fase gerak 0.06N H_2SO_4 dan kolom *Fast Acid H⁺*. Respon KCKT berupa puncak-puncak kromatogram yang mempunyai waktuambat (RT) yang spesifik. Identifikasi puncak dilakukan dengan membandingkan RT sampel terhadap RT standar. Luas puncak sebanding dengan jumlah analit tersebut.

4 Peralatan

- 0.2 μm polyethersulfone syringe filter;
- Homogenizer (blender);
- Kolom fast acid H^+ 100 x 7.8 mm;
- Mikropipet;
- Peralatan gelas;
- Sentrifugal kecepatan minimal 6.600 rpm dengan suhu 2 °C;
- Seperangkat alat KCKT dengan detektor ultra violet;
- Tabung sentrifugal 15 mL;
- Timbangan analitis;

- j) Vial KCKT;
- k) Vortex.

5 Perekasi

- a) Air pro KCKT.
- b) Larutan ekstraksi alkali
timbang 2.84 g *sodium phosphate dibasic* (Na_2HPO_4) ($\geq 99\%$, anhidrat) dan 1.82 g D-mannitol ($\geq 98\%$), larutkan dalam labu takar 1.000 mL dengan air pro KCKT sampai tanda batas (pH 9). Saring dengan filter membran 0,2 μm . Simpan pada suhu 4 °C tahan sampai 1 minggu.
- c) H_2SO_4 6 N
encerkan 15,98 mL H_2SO_4 pekat 37,5 N dalam labu takar 100 mL dengan air pro KCKT.
- d) H_2SO_4 0.06 N
encerkan 5 mL H_2SO_4 6 N dalam labu takar 500 mL dengan air pro KCKT. Larutan dibuat setiap melakukan analisa.
- e) Larutan stok standar sulfit 1.000 mg/L
timbang dengan seksama 158 mg *sodium sulfite* (Na_2SO_3) dan masukkan ke dalam labu takar 100 mL, larutkan dan tepatkan hingga 100 mL dengan larutan ekstraksi alkali.
- f) Larutan baku sulfit 100 mg/L
pipet 10 mL dari larutan stok sulfit 1.000 mg/L ke dalam labu takar 100 mL dan tambahkan dengan larutan ekstraksi alkali sampai tanda batas.
- g) Larutan baku kerja. Buat larutan baku kerja 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, dan 40 mg/L. Larutan baku kerja dapat disesuaikan dengan kondisi contoh uji. Siapkan larutan baku kerja ini setiap akan digunakan.

6 Kondisi KCKT

- a) Detektor : UV detektor dengan panjang gelombang 276 nm
- b) Kolom : fast acid H^+ 100 x 7.8 mm
- c) Fase gerak : 0,06 N H_2SO_4 selama 7 menit
- d) Volume injeksi : 10 μL
- e) Laju alir : 1 mL/menit

7 Prosedur

7.1 Ekstraksi

- a) Blender lebih kurang 100 g contoh hingga homogen.
- b) Timbang dengan seksama lebih kurang 1 g contoh yang telah homogen ke dalam tabung sentrifus 15 mL sesuai Tabel 1.

Tabel 1 – Persiapan *blanko*, *spike* dan contoh uji

Contoh	Berat contoh (g)	Volume larutan <i>spike</i> (1000 mg/L) yang ditambahkan (μL)
<i>Blanko</i> pereaksi	-	-
<i>Blanko</i> contoh	1	-
<i>Spike</i> 50 mg/kg	1	50
Contoh uji ke1...dst	1	-

- Selanjutnya *blanko*, *spike* dan contoh uji yang telah disiapkan ditambahkan 10 mL *alkaline extraction solution*, vortex selama 10 menit.
- Sentrifugasi dengan kecepatan 6.600 rpm pada suhu 2 °C selama 10 menit.
- Saring dengan *syringe filter* 0,2 μm dan masukkan ke dalam *vial*.
- Analit siap diinjeksikan ke KCKT.

7.2 Pembacaan larutan baku kerja (sebagai kalibrasi internal rutin)

Baca larutan baku kerja yang sudah disiapkan pada alat KCKT hingga mendapatkan kurva baku dengan koefisien regresi minimum 0,99. Apabila hasil pembacaan larutan baku kerja tersebut mendapat nilai koefisien regresi kurang dari 0,99 maka lakukan pengecekan terhadap kondisi alat dan larutan baku kerja. Jika nilai koefisien regresi telah mencapai lebih dari 0,99 maka kurva baku dengan persamaan $Y = a + bX$ dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi analit dalam contoh.

7.3 Pembacaan larutan *blanko*, *spike* dan contoh uji

Baca *blanko*, *spike* dan contoh uji dengan kondisi operasi alat yang sama pada saat kalibrasi internal rutin.

7.4 Perhitungan

Masukkan nilai masing-masing area contoh dari hasil pembacaan ke persamaan garis kurva baku.

$$Y = a + bX$$

dengan

- Y: nilai area;
- a: intersep;
- b: *slope* (kemiringan garis);
- X: konsentrasi contoh yang didapat (mg/L)

Setelah didapat nilai X, kalikan dengan volume akhir dan dibagi dengan berat contoh.

$$\text{Konsentrasi Sulfat (mg/kg)} = \frac{X \text{ (mg/L)} \times \text{Volume akhir (mL)} \times \frac{\text{L}}{1000 \text{ mL}}}{\text{Berat contoh (g)} \times \frac{\text{kg}}{1000 \text{ g}}}$$

8 Pelaporan

Jika angka desimal kurang dari 5 (lima) maka pembulatan ke bawah, tetapi bila lebih dari 5 (lima) pembulatan keatas.

CONTOH

14,454 dibulatkan menjadi 14,45

14,466 dibulatkan menjadi 14,47

Jika angka ketiga di belakang koma 5 (lima), dan angka kedua genap, maka angka 5 (lima) tersebut menjadi hilang tetapi bila angka kedua ganjil maka pembulatan keatas.

CONTOH

14,765 dibulatkan menjadi 14,76

14,475 dibulatkan menjadi 14,48

9 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisa maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

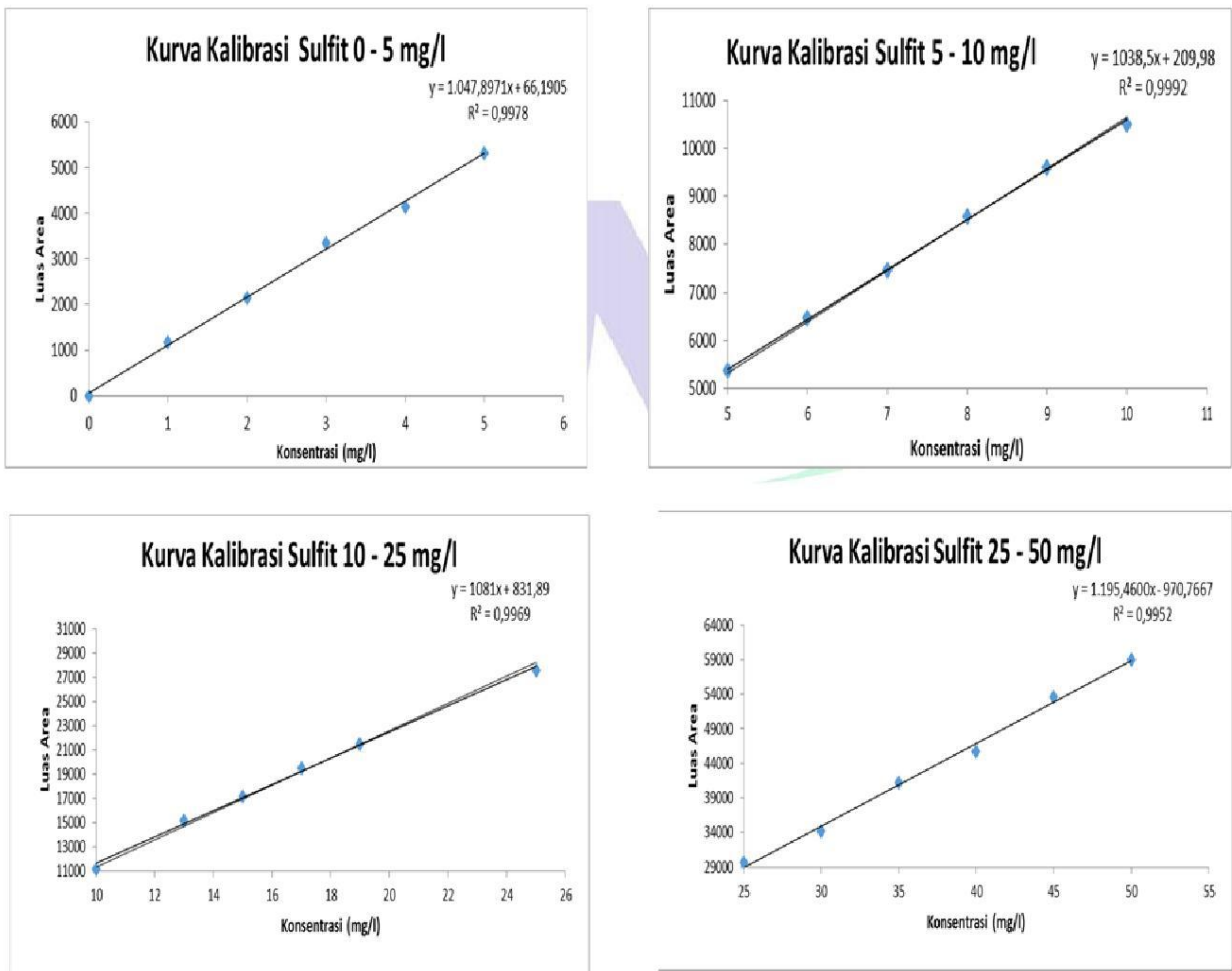
- a) Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisa.
- b) Gunakan jas laboratorium selama bekerja.

Lampiran A
(informatif)
Validasi metode penentuan kadar sulfit

A.1 Uji Linearitas

A.1.1 Linieritas kurva standar

Uji linearitas dilakukan dengan cara membuat kurva kalibrasi dengan 4 deret larutan standar kerja sulfit yaitu 0; 1; 2; 3; 4 dan 5 mg/L dengan nilai koefisien regresi yang didapat adalah 0,9978. Pada 5; 6; 7; 8; 9 dan 10 mg/L didapatkan nilai koefisien regresi sebesar 0,9992. Untuk deret 10; 13; 15; 17; 19 dan 25 mg/L nilai koefisien regresi yang didapat adalah 0,9969. Dan pada deret 25; 30; 35; 40; 45 dan 50 mg/L dengan nilai koefisien regresi yang didapat adalah 0,9952.

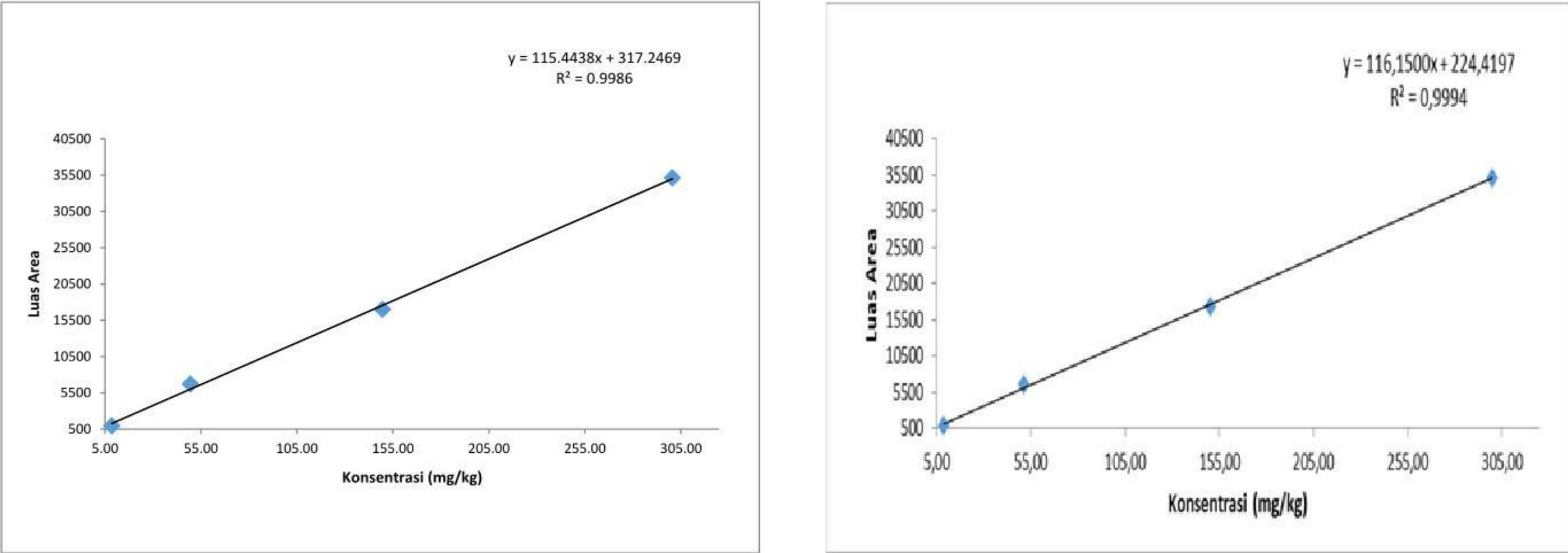


Gambar A.1 - Linieritas kurva kalibrasi

A.1.2 Linieritas *spike* contoh

Uji linearitas dilakukan dari data *spiked* contoh yang berasal dari data tabel akurasi, selanjutnya dibuat kurva antara konsentrasi *spiked* (blanko, 50, 150 dan 300 mg/kg) versus

area contoh. Nilai koefisien regresi rerata adalah 0,99 seperti pada gambar kurva linieritas sebagai berikut:



Gambar A.2 - Linieritas spike contoh

A.2 Uji batas deteksi sulfit

Pengujian LOD dilakukan dengan menguji blanko tujuh kali ulangan dan menghasilkan rerata konsentrasi 4,28 mg/kg. Sedangkan untuk LOQ dilakukan pengujian blanko tujuh kali ulangan yang menghasilkan rerata konsentrasi 8,35 mg/kg dengan %RSD 3,6. Dari rerata tersebut maka dapat ditentukan batas deteksi (LoD = 4,28 mg/kg) dan batas determinasi (LoQ = 8,35 mg/kg).

Tabel A.1 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi blanko LOD

Ulangan	Bobot contoh	Luas area	Konsentrasi hasil pengukuran	Konsentrasi
	(g)		(mg/L)	(mg/kg)
1	1,0441	644,3	0,5517	5,284
2	1,0531	696,2	0,6012	5,709
3	1,0582	523,2	0,4361	4,121
4	1,0301	497,5	0,4116	3,996
5	1,0385	475,4	0,3905	3,760
6	1,0620	480,5	0,3954	3,723
7	1,0183	422,2	0,3397	3,336
Rerata			0,447	4,276
SD			0,094	0,878
RSD			0,211	0,205
%RSD			21,14	20,54

Tabel A.2 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi blanko LOQ

Ulangan	Bobot contoh	Luas area	Konsentrasi hasil pengukuran	Konsentrasi
	(g)		(mg/L)	(mg/kg)
1	1,0198	978,5	0,8706	8,537
2	1,0137	970,5	0,8630	8,513
3	1,0166	995,3	0,8866	8,722
4	1,0121	935,4	0,8295	8,196
5	1,0102	928,3	0,8227	8,144
6	1,0085	894,7	0,7906	7,840
7	1,0091	962,3	0,8552	8,474
Rerata			0,845	8,347
SD			0,033	0,300
RSD			0,039	0,036
%RSD			3,90	3,60

A.3 Uji perolehan kembali (*recovery*) dan presisi pengujian sulfit

Uji *recovery* dengan menguji blanko sampel yang telah dispike larutan standar sulfit pada 1 g contoh udang dengan konsentrasi 1000 mg/L sebanyak 50 µl untuk nilai konsentrasi spike 50 mg/kg, 150 µl untuk nilai konsentrasi spike 150 mg/kg, dan 300 µl untuk nilai konsentrasi 300 mg/kg dilakukan 7 ulangan.

Pengujian contoh yang ditambahkan spike dengan larutan standar sulfit ke dalam contoh blanko dilakukan tujuh ulangan. Diperoleh hasil rerata 55,30 mg/kg untuk nilai konsentrasi spike 50 mg/kg, 147,76 mg/kg untuk nilai konsentrasi spike 150 mg/kg, dan 297,72 mg/kg untuk nilai konsentrasi spike 300 mg/kg dengan hasil uji rerata konsentrasi blanko contoh 8,35 mg/kg.

Bila dihitung setelah dikurangi konsentrasi blanko 8,35 mg/kg dan dibagi dengan masing-masing nilai konsentrasi target, maka nilai rerata *recovery* yang didapat adalah 93,9 % untuk nilai konsentrasi spike 50 mg/kg, 92,9 % untuk nilai konsentrasi spike 150 mg/kg dan 96,5 % untuk nilai konsentrasi spike 300 mg/kg. Berarti masih masuk dalam persyaratan *recovery* minimum untuk metode kuantitatif (CD 96/23/2002) yaitu 80% sampai 110%

Untuk nilai presisi pada konsentrasi spike 50 mg/kg didapatkan persen relatif deviasi (%RSD) sebesar 3,42 %, konsentrasi spike 150 mg/kg (%RSD) sebesar 1,95% dan konsentrasi spike 300 mg/kg (%RSD) sebesar 2,1% yang berarti sangat baik masuk dalam persyaratan rekomendasi IUPAC tentang Relatif Standar Deviasi (RSD) dengan persyaratan yang dapat diterima maksimal 6,82% sampai 8,88% berdasarkan perhitungan *Horwitz* untuk tingkat konsentrasi 50 mg/kg sampai 300 mg/kg.

Tabel A.3 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi spiking 50 mg/kg

Ulangan	Bobot contoh	Luas Area	<i>Spiked</i>	Konsentrasi hasil pengukuran	Konsentrasi	Recovery
	(g)		(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	%
1	1,0553	7.092	50	56,887	48,541	97,1
2	1,0312	6.509	50	53,140	44,794	89,6
3	1,0078	6.782	50	56,807	48,460	96,9
4	1,0118	6.748	50	56,284	47,937	95,9
5	1,0210	6.767	50	55,942	47,596	95,2
6	1,0222	6.644	50	54,801	46,454	92,9
7	1,0181	6.439	50	53,207	44,860	89,7
Rerata				55,295	46,949	93,90
SD				1,61	1,61	3,21
%RSD				2,90	3,42	3,42

Tabel A.4 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi spiking 150 mg/kg

Ulangan	Bobot contoh	Luas area	<i>Spiked</i>	Konsentrasi hasil pengukuran	Konsentrasi	Recovery
	(g)		(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	%
1	1,0224	16.710	150,0	143,657	135,310	90,2
2	1,0018	17.029	150,0	149,561	141,214	94,1
3	1,0165	17.346	150,0	150,278	141,932	94,6
4	1,0025	17.151	150,0	150,579	142,233	94,8
5	1,0025	16.968	150,0	148,895	140,549	93,7
6	1,0040	16.610	150,0	145,370	137,023	91,3
7	1,0086	16.753	150,0	146,017	137,671	91,8
Rerata				147,765	139,419	92,9
SD				2,72	2,72	1,8
%RSD				1,84	1,95	1,95

Tabel A.5 - Rekapitulasi luas area dan konsentrasi spiking 300 mg/kg

Ulangan	Bobot contoh	Luas area	<i>Spiked</i>	Konsentrasi hasil pengukuran	Konsentrasi	Recovery
	(g)		(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	%
1	1,0066	34.601	300,00	295,604	287,258	95,8
2	1,0106	33.516	300,00	285,458	277,111	92,4
3	1,0062	35.172	300,00	300,472	292,126	97,4
4	1,0009	35.336	300,00	303,435	295,088	98,4
5	1,0075	35.136	300,00	299,780	291,433	97,1
6	1,0053	34.828	300,00	297,875	289,528	96,5
7	1,0025	35.156	300,00	301,449	293,102	97,7
Rerata				297,725	289,378	96,5
SD				5,96	5,96	2,0
%RSD				2,00	2,06	2,1



Bibliografi

R. F. Mcfeeters and A. O. Barish, 2003, Sulfite Analysis of Fruits and Vegetables by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet Spectrophotometric Detection, Journal of Agricultural and Food Chemistry. No.51. 2003. p. 1513-1517.

Application Thermo Scientific.No.54. 2013. Determination of Total and Free Sulfite in Foods and Beverages.

